



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/64, A61K 38/36		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/66031 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Dezember 1999 (23.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT99/00154 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. Juni 1999 (14.06.99) (30) Prioritätsdaten: A 1043/98 17. Juni 1998 (17.06.98) AT (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MATTHIESSEN, Peter [DE/AT]; Waltergasse 12/2/6, A-1040 Wien (AT). TURECEK, Peter [AT/AT]; Hauptstrasse 59g, Weidling, A-3400 Klosterneuburg (AT). SCHWARZ, Hans-Peter [AT/AT]; Schindlergasse 32, A-1180 Wien (AT). (74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: PHARMACEUTICAL FACTOR VII PREPARATION (54) Bezeichnung: PHARMAZEUTISCHES FAKTOR VII-PRÄPARAT (57) Abstract <p>The invention relates to a preparation based on blood clotting factor VII with a fraction of less than 5 % of factor VIIa, which exhibits a specific activity of at least 50 E/mg and is stable in the absence of blood clotting inhibitors. The invention also relates to a method for producing such a preparation.</p> (57) Zusammenfassung <p>Beschrieben wird ein Präparat auf Basis von Blutgerinnungsfaktor VII mit einem Anteil von weniger als 5 % Faktor VIIa, welches eine spezifische Aktivität von mindestens 50 E/mg und eine Stabilität in Abwesenheit von Inhibitoren der Blutgerinnung aufweist, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Pharmazeutisches Faktor VII-Präparat

Die Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat auf Basis von Blutgerinnungsfaktor VII sowie ein Faktor VII Reinigungsverfahren.

Die Blutgerinnung wird durch eine Reihe von aufeinanderfolgenden Reaktionen verschiedener Blutgerinnungsfaktoren ausgelöst. Durch einen Mangel an Blutgerinnungsfaktoren wird die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und damit der Wundverschluß verhindert; die Folge ist ein erhöhtes Blutungsrisiko bzw. Blutungen. Ein solcher Fall liegt bei einem Mangel von Vitamin K-abhängigen Blutgerinnungsfaktoren, wie den Faktoren II, VII, IX und X vor, der vor allem durch die Beeinträchtigung der Leberfunktion, aber auch aufgrund eines vererbten Blutgerinnungsfaktormangel hervorgerufen sein kann. Zur Substitutionsbehandlung werden die entsprechenden Blutgerinnungsfaktoren eingesetzt. Die Behandlung mit diesen Präparaten führt in den meisten Fällen zu einer raschen Blutstillung.

Der Faktor VII kann aus biologischem Material, wie Blut, Plasma oder Zellkulturen gewonnen werden und wird im Fall von Blut oder Plasma als Ausgangsmaterial zumeist gemeinsam mit mindestens einem der strukturell ähnlichen Faktoren II, IX oder X in gereinigter Form erhalten. Ein Prothrombinkomplex-Präparat auf Basis der Faktoren II, VII, IX und X bzw. eine Plasmafraktion enthaltend den Prothrombinkomplex, kann ebenfalls als Ausgangsmaterial zur Herstellung eines weiter gereinigten Faktor VII-Präparates herangezogen werden.

Zur Behandlung von Patienten, bei denen ein Mangel an Faktor VIII auftritt und welche einen gegen den Faktor VIII gerichteten Hemmstoff (Inhibitor) entwickelt haben wird oftmals ein Faktor VIIa-Präparat vorgeschlagen. Hochgereinigte Faktor VIIa-Präparate werden z.B. in der EP 0 082 182 und von Hedner et al. (Haemostasis 19, 335-343 (1989)) beschrieben.

Der Faktor VII ist relativ leicht aktivierbar zum Faktor VIIa. Es wurde beispielsweise gefunden, daß Faktor VII-Zymogen durch eine Reihe von physiologischen Enzymen, wie Faktor IXa und Faktor Xa rasch aktiviert wird (Wildgoose et al., Blood, Vol. 73, No. 7, 1989, pp 1888-1895).

In der EP 0 770 625 ist beschrieben, daß mit zunehmenden Aufwand eines Reinigungsvorganges die Aktivierung des Faktor VII eintritt. Zur Vorbeugung des Risikos zur Faktor VIIa-Bildung wird dementsprechend der Zusatz von Inhibitoren der Blutgerinnung, beispielsweise Antithrombin III/Heparin oder reversible Inhibitoren, wie Benzamidin, während einer affinitätschromatographischen Reinigung vorgeschlagen.

Gleichermaßen wird das Faktor VII-Molekül während dessen Isolierung durch die Verwendung von Benzamidin während des gesamten Reinigungsverfahrens vor Proteolyse geschützt, wie von Radcliffe R et al., Journal Biological Chemistry 250, 1975, pp 388-395, beschrieben.

Das Problem der Aktivierung des Faktor VII vor allem in Gegenwart von Oberflächen mit positiver Ladung, z.B. bei Kontakt mit einem Anionenaustauschermaterial, wird von Pedersen et al. (Biochemistry, 28, 1989, 9331-9336) beschrieben. Dabei wurde gefunden, daß rekombinanter Faktor VII in Gegenwart von Benzamidin zu einem homogenen Protein gereinigt werden konnte. In Abwesenheit des Inhibitors wurde der rekombinante Faktor VII spontan aktiviert. Diese autokatalytische Aktivierung stellt daher auch bei Präparationen ein Problem dar, bei welchen die physiologischen Aktivierungskomponenten nicht einmal mehr in Spuren vorhanden sind.

Inhibitoren der Blutgerinnung sind in einem pharmazeutischen Präparat zur Behandlung von Zuständen, die auf einen Mangel eines Blutgerinnungsfaktors zurückzuführen sind, an sich nicht erwünscht. Zwar werden aus Stabilitätsgründen, nämlich um die Aktivierung der Blutgerinnungsfaktoren in Prothrombinkomplex-Präparaten, zu vermeiden, physiologische Inhibitoren, wie Antithrombin III oder Heparin zugesetzt. Es wäre jedoch wünschens-

wert, Präparate bereitzustellen, die möglichst ohne den Zusatz derartiger Inhibitoren eine ausreichende Stabilität aufweisen.

Die Erfindung stellt sich zur Aufgabe ein pharmazeutisches Faktor VII-Präparat bereitzustellen, mit einem möglichst geringen Anteil an aktiviertem Faktor VII, mit einer ausreichenden Stabilität in Abwesenheit von Inhibitoren der Blutgerinnung. Darüberhinaus soll ein Reinigungsverfahren zur Herstellung von Faktor VII-Präparaten zur Verfügung gestellt werden, welches in effizienter und schonender Weise durchgeführt werden kann, um auf den Einsatz von Inhibitoren, wie Benzamidin, zu verzichten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Präparat auf Basis von Blutgerinnungsfaktor VII gelöst, welches einen Anteil von weniger als 5% Faktor VIIa, eine spezifische Aktivität von mindestens 50 E/mg und eine Stabilität in Abwesenheit von Inhibitoren der Blutgerinnung aufweist.

Erfindungsgemäß ist es erstmals möglich, ein hochgereinigtes Faktor VII-Präparat herzustellen ohne Verwendung der bekannten Inhibitoren der Blutgerinnung, insbesondere ohne Zusatz von Antithrombin III und/oder Heparin, Benzamidin, Sojabohnen, Trypsin, Inhibitor, Phenylmethylsulfonylfluorid oder EDTA. Es hat sich herausgestellt, daß unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen der Faktor VII während eines chromatographischen Reinigungsverfahrens auch ohne den Schutz vor proteolytischen Enzymen bzw. Kontaktaktivierung nicht aktiviert wird. Somit enthält das hochgereinigte Faktor VII-Präparat nicht unbedingt einen der genannten Inhibitoren bzw. weniger als die Nachweisgrenze. Sobald eine spezifische Aktivität von mindestens 50 E/mg erhalten wurde, konnte überraschenderweise gezeigt werden, daß der Faktor VII außerordentlich stabil ist (sogar bezüglich autokatalytischer Aktivierungsprozesse), ohne daß es den Zusatz eines spezifischen FVII-Aktivierungs-Inhibitors bedarf.

Die Stabilität des hochgereinigten Faktor VII kann vor allem - jedoch nicht ausschließlich (vgl. Pedersen et al., 1989 bzgl. autokatalytischer Aktivierung) - auf die Abreicherung der Faktor VII-spezifischen Proteasen, darunter die Faktoren IXa und Xa,

zurückgeführt werden. Damit ist gewährleistet, daß ein Präparat, wie ein pharmazeutisches Infusionspräparat, auf Basis des hochgereinigten Faktor VII mit mindestens 50 E/mg Protein, vorzugsweise mindestens 100 E/mg, am meisten bevorzugt mindestens 500 E/mg Protein, in speziellen Fällen sogar mindestens 1000 E/mg bis zur theoretischen Reinheit von etwa 2000 E/mg, auch in Abwesenheit von Inhibitoren der Blutgerinnung über einen längeren Zeitraum in gebrauchsfertigem Zustand verbleiben kann, ohne den Anteil an Faktor VIIa im Präparat über das zulässige Maß zu erhöhen.

Das erfindungsgemäße Präparat hat einen Anteil von weniger als 5% Faktor VIIa bezogen auf die Gesamtmenge an Faktor VII, vorzugsweise weniger als 3%, am meisten bevorzugt weniger als die Nachweisgrenze (z.B. im Test nach Seligson et al., Haemostasis 13, 186-191, 1983).

Das erfindungsgemäße Präparat ist beispielsweise ein Konzentrat mit pharmazeutischer Qualität, welches zur Herstellung von pharmazeutischen Kombinationspräparaten eingesetzt werden kann. Derartige Kombinationspräparate können weitere Wirksubstanzen, wie Vitamin K-abhängige Proteine, darunter einen oder mehrere der Blutfaktoren II, IX, X, Protein C oder Protein S enthalten. So kann etwa ein Prothrombinkomplex-Präparat enthaltend die Faktoren II, VII, IX und X durch Zumischen des erfindungsgemäßen Faktor VII-Präparates zu einem partiellen Prothrombinkomplex hergestellt werden.

Das erfindungsgemäße Faktor VII-Infusionspräparat kann aufgrund der geringen Belastung mit Verunreinigungen in relativ hoch konzentrierter Form zur Verfügung gestellt werden, beispielsweise mit einer Konzentration von 50 bis 5000 E/ml. Damit wird die Verabreichung des Präparates als Bolus-Injektion oder kurzzeitige Infusion wesentlich vereinfacht.

Die Stabilität des Präparates kann in gebrauchsfertigem Zustand getestet werden, ob es die erfindungsgemäßen Stabilitätskriterien erfüllt, und zwar durch Inkubation bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden, vorzugsweise mehr als

30 Stunden. Dabei kann festgestellt werden, daß das erfindungsgemäße Präparat immer noch weniger als 5% Faktor VIIa enthält.

Das erfindungsgemäße Präparat kann aber auch in einer haltbaren Handelsform zur Verfügung gestellt werden, vorzugsweise als Lyophilisat. Nach Rekonstitution zeigt sich wieder die außerordentliche Stabilität und es kommt auch während der Lyophilisierung/Rekonstitution zu keinerlei negativen Effekten bezüglich der (vorzeitigen) FVII-Aktivierung. Weitere Formen sind tiefgefrorene Präparate oder Flüssigpräparate, welche gegebenenfalls nach Zusatz von Stabilisatoren, wie Trägerproteine und/oder Kohlenhydrate, vorzugsweise bei 4°C über einen längeren Lagerungszeitraum stabil sind.

Der Faktor VII im erfindungsgemäßen Präparat ist - trotz seiner Stabilitätseigenschaften (auch bezüglich Autoaktivierung) - jedenfalls ein aktivierbarer Faktor VII, der ohne weiteres z.B. in vivo aktiviert werden kann, und dann entsprechend dem nativen Faktor VII blutgerinnungsaktiv ist. Vorzugsweise wird ein natives Faktor VII-Protein eingesetzt, beispielsweise humaner plasmatischer Faktor VII, oder humaner rekombinanter Faktor VII. Bei der Rekombination von Nukleinsäuren können auch Faktor VII-Analoga eingesetzt werden, welche jedenfalls gleichermaßen oder in einem erhöhten Ausmaß aktivierbar sind (Sridhara et al., Am. J. Hematology 53, 66-71, 1996).

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von Faktor VII aus einem biologischen Material und Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor VII-Präparation durch Adsorption des Faktor VII an ein Chromatographiematerial, fraktionierte Elution des Faktor VII mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 50 E/mg, wobei die Elution mit einem Puffer ohne Zusatz von Inhibitoren der Blutgerinnung vorgenommen wird, und Gewinnen des Faktor VII aus dem Eluat.

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung des erfindungsgemäßen Faktor VII-Präparates wird üblicherweise ein komplexes biologisches Material eingesetzt. Dazu zählen Blut, Plasma, Plasmafraktionen, Zellkulturen bzw. Zellkulturfraktionen. Es kann aber auch ein

Präparat mit pharmazeutischer Qualität als Ausgangsmaterial eingesetzt werden, welches neben dem Faktor VII auch weitere Proteine enthält, beispielsweise ein Prothrombinkomplex-Präparat enthaltend die Faktoren II, VII, IX und X.

Zu Vermeidung des Risikos der Übertragung von humanpathogenen Infektionserregern, darunter die von durch Blut übertragbaren Viren, wie HIV und Hepatitisviren, z.B. HAV, HBV, HCV, HGV, und Parvoviren, aber auch die infektiösen Erreger von BSE und CJD, werden eine Reihe von Maßnahmen vorgenommen. Der Faktor VII kann jeweils vor oder nach der chromatographischen Reinigung einem Verfahren zur Inaktivierung bzw. Abreicherung der Humanpathogene unterzogen werden. Vorzugsweise werden mindestens zwei Maßnahmen vorgenommen, die die Inaktivierung bzw. Abreicherung aufgrund eines unterschiedlichen Mechanismus bewirken. Dazu zählen chemische, chemisch-physikalische und physikalische Methoden. Die Methoden unter Einsatz von viruziden Substanzen werden vorzugsweise vor bzw. während des chromatographischen Reinigungsverfahrens vorgenommen, damit gleichzeitig mit der Reinigung des Faktor VII auch das viruzide Mittel entfernt werden kann.

Zu den effektiven Maßnahmen zur Inaktivierung von Viren zählen beispielsweise die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln und/oder Detergenzien (EP 0 131 740, EP 0 050 061, PCT/AT98/00090), die Behandlung mit chaotropen Mitteln (WO 90/15613) Hitzebehandlungsverfahren, vorzugsweise in lyophilisiertem, trockenen oder feuchten Zustand (siehe EP 0 159 311), Kombinationsverfahren (EP 0 519 901) und physikalische Methoden. Letztere bewirken die Inaktivierung von Viren beispielsweise durch Bestrahlung mit Licht, etwa in Gegenwart von Photosensibilisatoren (EP 0 471 794 und WO 97/37686).

Zu den Abreicherungsverfahren der Humanpathogene zählen insbesondere die Filtrationen unter Verwendung von Ultrafiltern, Tiefenfiltern oder Nanofiltern (s. WO 97/40861, AT A 1029/97). Aber auch Fällungsschritte bzw. andere Proteinreinigungsmaßnahmen, wie die der Adsorption, tragen zur Abreicherung von möglicherweise vorhandenen Pathogenen bei.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Reinigung von Faktor VII und Herstellung eines Faktor VII-Präparates umfaßt mindestens eine Chromatographiestufe. Dabei wird der Faktor VII adsorbiert und selektiv eluiert, wobei Fraktionen gewonnen werden. Zur weiteren Gewinnung des Faktor VII aus dem Eluat werden diejenigen Fraktionen gewählt, in der die spezifische Aktivität mindestens 50 E/mg Protein, vorzugsweise mindestens 100 E/mg, beträgt, vorzugsweise mindestens die zuvor genannten höher gereinigten Proteine.

Als Elutionspuffer wird vorzugsweise ein Puffer mit einem pH im neutralen Bereich, etwa im Bereich von 5-9, vorzugsweise von 6-7,5, eingesetzt und einer Ionenstärke entsprechend einem Gehalt an NaCl von weniger als 1 M eingesetzt. Wie bereits zuvor beschrieben, werden dem Elutionspuffer keine der genannten Inhibitoren der Blutgerinnung zugesetzt. Eventuell vorhandene physiologische Inhibitoren, die im Ausgangsmaterial vorliegen, werden bereits bei der Adsorption und gegebenenfalls bei der darauffolgenden Reinigung des adsorbierten Faktor VII mit einem Waschpuffer abgetrennt, so daß der Faktor VII jedenfalls ohne Inhibitorgehalt gewonnen wird. Auch hier zeigt sich die außerordentliche Stabilität des hochgereinigten Faktor VII, der dann den weiteren üblichen Aufbereitungsmaßnahmen zur Herstellung eines pharmazeutischen oder diagnostischen Präparates unterzogen werden kann.

Die Chromatographie wird entweder im Batchverfahren oder in einer Säule durchgeführt. Zur verbesserten Kontrolle der Flußrate bzw. der Kontaktzeit des Faktor VII mit dem Chromatographiematerial ist das Säulenverfahren bevorzugt. Bevorzugte Materialien sind Träger mit positiv geladenen Liganden, die als Anionenaustauscher eingesetzt werden können.

Als Anionenaustauscher kommen im Prinzip alle Anionenaustauscher auf Basis von Kohlenhydraten oder synthetischen Polymeren in Frage, die eine Affinität zu Faktor VII (Prothrombin) aufweisen, wie z.B. DEAE-Sephacel®, DEAE-Sephadex®, DEAE-Sepharose CL6B®, DEAE-Sepharose Fast Flow®, QAE-Sephadex®, Q-Sepharose Fast Flow®, Q-Sepharose High Performance®, Q-Sepharose Big Beads® (alle Fa. Pharmacia);

DEAE-Tris-Acryl®, DEAE-Spherodex®, Q-Hyper-D® (alle Fa. Sepracor);
Macrorep DEAE®, Macrorep Q® (alle Fa. BioRad);
DEAE-Toyopearl®, QAE-Toyopearl®, Toyopearl Super-Q® (alle Fa. Tosohaas);
Protein PAK DEAE® (Waters);
Fractogel EMD-TMAE®, Fractogel EMD-DEAE®, Fractogel EMD-DMAE®,
Licrospher 1000 TMAE®, Licrospher 1000 DEAE® und Licrospher
4000 DMAE® (alle Fa. MERCK).

Insbesondere werden druckstabile Ionenaustauscher eingesetzt wie z.B. Fractogel TMAE-EMD, Express IonQ, Sonree 30Q. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß sogar an diesen Materialien das Phänomen der Aktivierung des Faktor VII unterbleibt sobald die Kontaktzeit mit dem Anionenaustauschermaterial bzw. die Verweilzeit auf der Säule kurz gehalten wird z.B. weniger als 5 min. In einer Säule wird dementsprechend vorzugsweise eine Flußrate von mindestens 2,5 cm/Minute, vorzugsweise 3,0 cm/Minute, für die Elution des adsorbierten Faktor VII gewählt.

Die Flußrate entspricht zumeist mindestens 0,15 Säulenvolumina pro Minute, vorzugsweise 0,17, am meisten bevorzugt 0,2 Säulenvolumina pro Minute.

Weitere Materialien zur chromatographischen Reinigung sind Träger mit Liganden, die eine spezifische Affinität für Faktor VII aufweisen, wie Tissue factor, Antikörper und Peptide. Weiters bevorzugte Materialien weisen hydrophobe Gruppen auf.

Als Gel für die hydrophobe Interaktionschromatographie wird vorzugsweise Phenyl-Sepharose High Performance® (Fa. Pharmacia), aber auch andere Chromatographiegele wie z.B. Butyl-Sepharose®, Octyl-Sepharose®, Phenyl-Sepharose®, Phenyl-Sepharose Fast Flow High Sub®, Phenyl-Sepharose Fast Flow Low Sub® (alle Fa. Pharmacia);
Fractogel TSK-Butyl® (Fa. MERCK);
Macrorep-Methyl-HIC-Support®, Macrorep t-Butyl-HIC-Support® (alle Fa. BioRad);

TSK-Gel Butyl Toyopearl®, TSK-Gel Phenyl Toyopearl® und TSK-Gel Ether Toyopearl® (alle Fa. Tosohaas), eingesetzt.

Als weitere Trägermaterialien kommen auch übliche Gelfiltrationsmedien in Frage, wie z.B. Superose 12, Superdex 75.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Herstellung eines Faktor VII-Präparates auch Kombinationen der genannten chromatographischen Verfahren eingesetzt, beispielsweise die Kombination der Anionenaustauscherchromatographie und hydrophoben Interaktionschromatographie. Gegebenenfalls kann anschließend noch zur weiteren Reinigung eine Gelfiltration vorgenommen werden. Dementsprechend wird bevorzugterweise im erfindungsgemäßen Verfahren als Chromatographiematerial ein Anionenaustauscher eingesetzt und ein für die hydrophobe Chromatographie geeignetes Material.

Der erfindungsgemäß gereinigte Faktor VII kann nicht nur durch die üblichen Maßnahmen der Dialyse/Diafiltration, Sterilfiltration und Konzentration zu einem pharmazeutischen Faktor VII-Präparat formuliert werden. Ebenso können auch Kombinationspräparate zur Verfügung gestellt werden, welche den erfindungsgemäß gereinigten Faktor VII neben anderen Wirksubstanzen enthalten.

Insbesondere kann ein Prothrombinkomplex-Präparat erfindungsgemäß zur Verfügung gestellt werden, welches neben dem hochgereinigten und stabilen Faktor VII noch mindestens einen der Blutgerinnungsfaktoren II, IX und X enthält. Diese weiteren Blutgerinnungsfaktoren sind vorzugsweise ebenfalls als Einzelfaktoren gereinigt, bevor das Kombinationspräparat durch entsprechendes Formulieren hergestellt wird. Ein derartiges Präparat kann mit oder ohne Inhibitoren der Blutgerinnung zur Verfügung gestellt werden. Insbesondere kann ein Heparingehalt vorgesehen werden, entsprechend einer Empfehlung von Menache et al., Thrombosis Diathes. Haemorrh. 33, 645-647, (1975) zur Bereitung von Faktor IX-hältigen pharmazeutischen Präparaten.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein pharmazeutisches Präparat, enthaltend einen erfindungsgemäßen Faktor VII

bzw. ein erfindungsgemäßes Faktor VII-Präparat. Dieses Präparat kann vorzugsweise weiters mindestens einen, insbesondere alle, der Blutgerinnungsfaktoren II, IX und X enthält.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Präparat als pharmazeutisches Infusionspräparat formuliert.

Weitere Zusätze zum erfindungsgemäßen Präparat sind vorzugsweise Antithrombin III und/oder Atheplex, welches einen Antithrombin III/Heparinkomplex darstellt, z.B. hergestellt gemäß EP 0 129 534.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele noch weiter beschrieben.

B e i s p i e l 1 : Reinigung von Faktor VII aus Kryoüberstand durch Anionenaustauscherchromatographie an Fraktogel TMAE-EMD

340 l Kryoüberstand werden an $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbiert und mit 22,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ /l (pH 8,5) enthaltend 1 % (V/V) Tween 80 (-pflanzlich) eluiert und mit AT III/Heparin-Komplex versetzt (350 IE Heparin/kg Eluat, 40 IE AT III/kg Eluat). Das Tween-haltige Eluat wird durch Ultrafiltration an einer Membran mit einer Ausschlußgrenze $\leq 30 \text{ kD}$ ca. 15-fach konzentriert und gegen 10 Volumina 20 mM Tris/HCl (pH 7,0) (Tris-Puffer) diafiltriert. Nach 0,2 μ -Filtration und Einstellen der Tweenkonzentration auf 15 % (V/V) wird zur Virusinaktivierung 3 Stunden lang bei 40°C inkubiert. Die mit Trispuffer auf das doppelte Volumen verdünnte Lösung (3 l) wird auf eine BPG100/165 Fraktogel TMAE-EMD 650 M-Säule (Fa. MERCK) aufgetragen, mit Trispuffer nachgewaschen und anschließend mit steigenden NaCl-Stufengradienten (50, 100, 150, 200, 250, 1000 mM/l) in Trispuffer gewaschen, eluiert und regeneriert. Die Flußrate beträgt bei der Betthöhe von 16,5 cm mindestens 2,5 bis 3 cm/min.

Das 200 mM-NaCl-Eluat (ca. 5 l) wird nach Zusatz von 43,8 IE Heparin/kg und 5,0 IE ATIII/kg durch Ultrafiltration an einer Membran mit einer Ausschlußgrenze $\leq 30 \text{ kD}$ ca. 60-fach auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml konzentriert. Nach Diafiltration

gegen eine Lösung von 4,8 mM Na-Citrat x 2 H₂O und 61,6 mM NaCl/l wird der pH auf einen Wert von 8,0 +/- 0,5 eingestellt und die Lösung eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird bis zu einer Restfeuchte von 7 - 8% befeuchtet und für die Virusinaktivierung 10 Stunden bei 60°C und 1 Stunde bei 80°C erhitzt.

T a b e l l e 1

Ergebnis

Fraktion	Spezif. Akt.*	FVII-Aktivierung**	Reinigungsfaktor
	[E FVII/mg Prot.]	[E FVIIa/E FVII]	
Plasma	0,02	-	1
Al(OH) ₃ -Eluat n. Tween	5	0,05	200
TMAE-Eluat	100	0,25	5.000
hitzebehandeltes Lyophilisat	100	0,35	5.000

* : maximale theoretische spezifische Aktivität: 2000 E FVII/mg Protein

** : vollständige Aktivierung bei einem FVIIa/FVII-Verhältnis von 15-20

B e i s p i e l 2 : Reinigung von Faktor VII aus Kryoüberstand durch Anionenaustauscherchromatographie an Fraktogel TMAE-EMD und nachfolgender hydrophober Chromatographie an Phenyl-Sepharose

Bis zur Herstellung des hitzebehandelten Präparates (Bulkpulver) wird wie in Beispiel 1 verfahren. Das Bulkpulver wird im ursprünglichen Volumen mit Milli Q-Wasser (Fa. Millipore) gelöst (Proteinkonzentration ca. 5 mg/ml), von 60 auf 2000 mM NaCl/l aufgesalzen und auf eine XK50/96 Phenyl-Sepharose HP-Säule (Fa. Pharmacia) aufgetragen, die in 20 mM Tris/HCl (pH 7,4; 2000 mM NaCl/l) equilibriert worden war. Nach Auftrag von 75 ml FVII-Bulkpulverlösung bei einer Flußrate von 10 ml/min wird mit ca. 10 SV Equilibrierungspuffer nachgewaschen und anschließend mit den folgenden NaCl-Stufen gewaschen, eluiert bzw. regeneriert:

1200 mM NaCl/l

850 mM NaCl/l

500 mM NaCl/l

0 mM NaCl/l, jeweils in 20 mM Tris/HCl (pH 7,4)

Ca. 2,8 l des 850 mM NaCl-Eluats werden anschließend durch Ultrafiltration an einer Membran mit einer Ausschlußgrenze ≤ 30 kD 5-fach konzentriert und gegen 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat diafiltriert und unter Sublimation der Salze lyophilisiert. Das salzfreie Lyophilisat wird in 1/50 des ursprünglichen Volumens in 0,4% Na,-Citrat x 2 H₂O 0,8 % NaCl (pH 7,0) aufgenommen und an einer im gleichen Puffer equilibrierten XK26/100 Superose 12-Säule (Fa. Pharmacia) unter geringer Aufreinigung bei einer Flußrate von 2,5 ml/min umgepuffert.

T a b e l l e 2

Ergebnis

Fraktion	Spezif. Akt. [E FVII/mg Prot.]	FVII-Aktivierung [E FVIIa/E FVII]	F VII-Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Plasma	0,02	-	-	1
Al(OH) ₃ -Eluat n. Tween	5	0,05	100	200
TMAE-Eluat	100	0,25	80	5.000
hitzebehandeltes Lyophilisat	100	0,35	61	5.000
Phenyl-Seph.-Eluat	500	0,4	43	25.000
Superose 12-Eluat	1000	0,5	35	50.000

B e i s p i e l 3 : Einfluß der Flußrate auf die Aktivierung von Faktor VII an Fraktogel TMAE-EMD

An einer XK26/16,5 Fraktogel TMAE-EMD 650 M-Säule (Fa. MERCK) wurde die Aufreinigung von FVII aus Al(OH)₃-Eluat nach Virusinaktivierung mit 15 % Tween (Auftrag 36 mg Protein/ml Gel) bei verschiedenen Flußraten bei 22°C getestet. Die Bedingungen der Chromatographie entsprechen Beispiel 1.

T a b e l l e 3

Ergebnis

Flußrate [cm/min]	Aktivierung [E F7a / E F7]
0,94	7,6
1,88	2,65
2,35	0,45
2,83	0,24

Es zeigt sich, daß bei zunehmender Flußgeschwindigkeit der Gehalt an aktiviertem Faktor VII abnimmt. Die Aktivierungsrate bleibt dann ab einem Wert von über etwa 2,5 bis 3 cm/s ungefähr konstant.

B e i s p i e l 4 : Test zur Bestimmung der Stabilität der FVII-Präparation**4.1. Inkubationsbedingungen**

100-300 µl-Aliquots der FVII-haltigen Eluate der TMAE- bzw. Phenyl-Sepharose-Chromatographie, hergestellt gemäß Beispiel 1 und 2, wurden für 38 Stunden bei 22°C inkubiert und nach dieser Zeit die amidolytische FVII-Aktivität (Immunochrom FVII:C, Fa. IMMUNO AG), die FVIIa-Gerinnung (Staclot VIIa-Rtf, Fa. Diagnostica Stago) und die Proteinkonzentration (Bradford) im Vergleich zu einem sofort bei -20°C eingefrorenem Aliquot getestet.

4.2. Aktivitätstests**4.2.1. IMMUNOCHROM FVII:C**

Die Faktor VII-Aktivität wurde unter Bedingungen einer vollständigen Aktivierung von FVII durch Thromboplastin und Ca²⁺ und der dann folgenden Aktivierung von ebenfalls zugesetztem FX mit einem chromogenen FXa-Substrat kinetisch gemessen. Es wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verfahren.

4.2.2. STACLOT VIIa-rTF

Mit rekombinantem löslichen Tissue factor läßt sich in Gegenwart von Phospholipid und FVII-Mangelplasma allein die durch FVIIa ausgelöste Gerinnung mit Hilfe eines Coagulometers messen. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers Diagnostica Stago verfahren.

4.3. Ergebnis

Fraktion	Protein. [mg/ml]	E FVII chrom/mg Spez. Akt.	E FVIIa Aktivier. t=0	E FVIIa Aktivier. t=38
TMAE, 200 mM	0,04-0,08	150-200	0,1 - 0,3	0,3 - 0,8
Phenyl-Seph., 750 mM	0,02-0,04	500-1000	0,1 - 0,2	0,1- 0,3

Es zeigt sich, daß bei den erfindungsgemäß hergestellten Präparaten selbst bei 38-stündiger Lagerung bei 22°C keine nennenswerte Aktivierung von FVII auftritt. Dies ist um so überraschender, als bei bislang bekannten Faktor VII-Präparaten immer eine erhebliche Aktivierung (u.a. auch durch Autokatalyse) eingetreten ist, die nur durch den Zusatz von spezifischen Inhibitoren verhindert bzw. hintangestellt werden konnte.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Präparat auf Basis von Blutgerinnungsfaktor VII mit einem Anteil von weniger als 5% Faktor VIIa, gekennzeichnet durch eine spezifische Aktivität von mindestens 50 E/mg und einer Stabilität in Abwesenheit von Inhibitoren der Blutgerinnung.
2. Präparat nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine spezifische Aktivität von mindestens 100 E/mg.
3. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, mit einer Faktor VII-Konzentration von 50 bis 5000 E/ml.
4. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, in lyophilisierter Form.
5. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, welches im gebrauchsfertigen Zustand bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden stabil ist.
6. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Faktor VII ein aktivierbarer rekombinanter Faktor VII ist.
7. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Faktor VII nativer plasmatischer Faktor VII ist.
8. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, erhältlich durch ein chromatographisches Reinigungsverfahren und fraktionierte Elution des Faktor VII ohne Zusatz von Inhibitoren der Blutgerinnung.
9. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es als pharmazeutisches Infusionspräparat formuliert ist.
10. Verfahren zur Reinigung von Faktor VII aus einem biologischen Material und Herstellung eines Faktor VII-Präparates durch

Adsorption des Faktor VII an ein Chromatographiematerial, fraktionierte Elution des Faktor VII mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 50 E/mg, wobei die Elution mit einem Puffer ohne Zusatz von Inhibitoren der Blutgerinnung vorgenommen wird, und Gewinnen des Faktor VII aus dem Eluat.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Chromatographiematerial ein Anionenaustauscher in einer Säule eingesetzt wird und die Flußrate der Elution mindestens 0,15 Säulenvolumina pro Minute beträgt.

12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Chromatographiematerial ein Träger mit hydrophoben Gruppen eingesetzt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Chromatographiematerial ein für die Gelfiltration geeigneter Träger eingesetzt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Faktor VII aus Blut, Plasma, einer Plasmafraktion, einer Zellkultur oder einer Zellkulturfraktion gereinigt wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Faktor VII aus der eluierten Fraktion gewonnen wird, die den Faktor VII mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 100 E/mg enthält.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Chromatographiematerial ein Anionenaustauscher eingesetzt wird und als weiteres Chromatographiematerial ein für die hydrophobe Chromatographie geeignetes Material.

17. Pharmazeutisches Präparat enthaltend einen Faktor VII erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16.

18. Präparat nach Anspruch 17, welches weiters mindestens einen der Blutgerinnungsfaktoren II, IX und X enthält.

19. Präparat nach Anspruch 17 oder 18, welches weiters Heparin enthält, gegebenenfalls in Gegenwart von Antithrombin III bzw. Atheplex.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Präparat auf Basis von Blutgerinnungsfaktor VII mit einem Anteil von weniger als 5 % Faktor VIIa, welches eine spezifische Aktivität von mindestens 50 E/mg und eine Stabilität in Abwesenheit von Inhibitoren der Blutgerinnung aufweist, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ AT 99/00154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6 C12N 9/64 A61K 38/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 770 625 A (BEHRINGWERKE AG) 2 May 1997 (02.05.97) cited in the application	1-10, 14, 15, 17
Y	the whole document	18,19
X	WO 94 22905 A (NOVONORDISK AS; JOERGENSEN TONY (DK); PEDERSEN ANDERS HJELHOLT (DK) 13 October 1994 (13.10.94)	1-6, 8-11,14,15
Y	example 2	18,19
Y	DE 195 31 637 A (IMMUNO AG) 6 March 1997 (06.03.97) claims 5,6	18
Y	EP 0 129 634 A (DRETTNER BORJE) 2 January 1985 (02.01.85) cited in the application page 1, line 5-13	19
A	BAJAJ S P ET AL: "Isolation and characterization of human factor VII" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Vol. 256, No. 1, 1981, pages 253-259, XP002118780 MD US	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 October 1999 (14.10.99)

Date of mailing of the international search report
25 October 1999 (25.10.99)

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office

Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ AT 99/00154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0770625 A	02-05-1997	DE 19538715 A AU 706057 B AU 7022696 A CA 2188093 A JP 9165397 A	30-04-1997 10-06-1999 24-04-1997 19-04-1997 24-06-1997
WO 9422905 A	13-10-1994	AU 677309 B AU 6423994 A CA 2159313 A CN 1121723 A,B CZ 9502533 A EP 0691984 A FI 954649 A HU 72712 A JP 8508264 T NO 953883 A PL 310887 A US 5700914 A ZA 9401956 A	17-04-1997 24-10-1994 13-10-1994 01-05-1996 17-01-1996 17-01-1996 29-09-1995 28-05-1996 03-09-1996 28-11-1995 08-01-1996 23-12-1997 30-09-1994
DE 19531637 A	06-03-1997	CA 2184226 A EP 0765669 A JP 9110715 A NO 963568 A US 5891843 A	01-03-1997 02-04-1997 28-04-1997 03-03-1997 06-04-1999
EP 0129634 A	02-01-1985	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00154

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N/64 A61K38/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 770 625 A (BEHRINGWERKE AG) 2. Mai 1997 (1997-05-02) in der Anmeldung erwähnt	1-10, 14, 15, 17
Y	das ganze Dokument	18, 19
X	WO 94 22905 A (NOVONORDISK AS ; JOERGENSEN TONY (DK); PEDERSEN ANDERS HJELHOLT (DK) 13. Oktober 1994 (1994-10-13)	1-6, 8-11, 14, 15
Y	Beispiel 2	18, 19
Y	DE 195 31 637 A (IMMUNO AG) 6. März 1997 (1997-03-06) Ansprüche 5, 6	18
Y	EP 0 129 634 A (DRETTNER BORJE) 2. Januar 1985 (1985-01-02) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeile 5-13	19

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Oktober 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25/10/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van der Schaal, C

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT 99/00154

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BAJAJ S P ET AL: "Isolation and characterization of human factor VII"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.,</p> <p>Bd. 256, Nr. 1, 1981, Seiten 253-259,</p> <p>XP002118780</p> <p>MD US</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung: , die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC./AT 99/00154

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0770625 A	02-05-1997	DE 19538715 A	30-04-1997
		AU 706057 B	10-06-1999
		AU 7022696 A	24-04-1997
		CA 2188093 A	19-04-1997
		JP 9165397 A	24-06-1997
WO 9422905 A	13-10-1994	AU 677309 B	17-04-1997
		AU 6423994 A	24-10-1994
		CA 2159313 A	13-10-1994
		CN 1121723 A, B	01-05-1996
		CZ 9502533 A	17-01-1996
		EP 0691984 A	17-01-1996
		FI 954649 A	29-09-1995
		HU 72712 A	28-05-1996
		JP 8508264 T	03-09-1996
		NO 953883 A	28-11-1995
		PL 310887 A	08-01-1996
		US 5700914 A	23-12-1997
		ZA 9401956 A	30-09-1994
DE 19531637 A	06-03-1997	CA 2184226 A	01-03-1997
		EP 0765669 A	02-04-1997
		JP 9110715 A	28-04-1997
		NO 963568 A	03-03-1997
		US 5891843 A	06-04-1999
EP 0129634 A	02-01-1985	KEINE	

